

褐飞虱对吡虫啉的抗性机理和靶标分子毒理学

刘泽文*, 张懿熙, 姚香梅, 李 健, 鲍海波

(南京农业大学植物保护学院, 农业部病虫监测与治理重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 是水稻最重要的害虫之一, 长期依赖化学防治导致了该害虫对不同类型杀虫剂抗性的产生, 对新烟碱类杀虫剂吡虫啉高水平抗性的产生更是造成了巨大的粮食生产损失。近年来在褐飞虱对吡虫啉抗性机理, 以及在抗药性机理研究推动下吡虫啉作用靶标褐飞虱神经系统烟碱型乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs) 毒理学等方面取得了许多研究进展。nAChRs 是昆虫神经系统中最重要神经递质受体, 是几类重要杀虫剂的作用靶标, 其中以新烟碱类杀虫剂为代表。通过对比敏感品系和室内连续筛选获得的高抗吡虫啉品系, 在褐飞虱两个 nAChRs 亚基 $Nl\alpha 1$ 和 $Nl\alpha 3$ 中均发现了抗性相关点突变 Y151S, 该突变导致了受体与吡虫啉结合亲和力的显著下降, 而对内源神经递质乙酰胆碱的亲合力影响很小。 $Nl\alpha 1$ 与褐飞虱另外两个亚基 $Nl\alpha 2$ 和 $Nl\beta 1$ 共聚成一个受体, 构成吡虫啉低亲和力结合位点; $Nl\alpha 3$ 与褐飞虱另外两个亚基 $Nl\alpha 8$ 和 $Nl\beta 1$ 共聚成一个受体, 构成吡虫啉高亲和力结合位点。不仅褐飞虱 nAChRs 与吡虫啉抗性相关, 某些 nAChRs 附属蛋白也直接影响褐飞虱对吡虫啉的抗性, 如 Lynx 蛋白。关于褐飞虱 nAChRs 组成、抗药性相关变异、受体附属蛋白对抗药性的影响等方面的研究, 均为国内外前沿报道, 不仅有助于对新烟碱类杀虫剂抗性机理的理解, 对昆虫 nAChRs 毒理学同样具有很大的推动作用。

关键词: 褐飞虱; 烟碱型乙酰胆碱受体; 亚基组成; 新烟碱类杀虫剂; 抗药性

中图分类号: Q965.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2010)06-0683-06

Imidacloprid resistance mechanisms in *Nilaparvata lugens* and pharmacological properties of its nicotinic acetylcholine receptors

LIU Ze-Wen*, ZHANG Yi-Xi, YAO Xiang-Mei, LI Jian, BAO Hai-Bo (Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Disease and Insect, Ministry of Agriculture, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, is a major rice pest in many parts of Asia. Insecticides have been extensively used for its control, and resistance to various insecticides in this species has been reported in different countries and areas. The resistance to imidacloprid, a neonicotinoid insecticide, in *N. lugens* had caused big loss in rice production in recent years. Meantime, great progresses have been achieved in its imidacloprid resistance mechanisms and nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), the target of neonicotinoid insecticides. nAChR is an important neurotransmitter receptor in insect central nervous system, which makes it become the important target to several kinds of insecticides, including neonicotinoid insecticides extensively used to control *N. lugens* in recent years. The Y151S mutation had been identified in two *N. lugens* nAChRs α subunits, $Nl\alpha 1$ and $Nl\alpha 3$, which have distinct influence on imidacloprid affinity, but little influence on acetylcholine. $Nl\alpha 1$, $Nl\alpha 2$ and $Nl\beta 1$ are co-assembled into one receptor, which constitutes the lower affinity binding site for imidacloprid in *N. lugens*, while $Nl\alpha 3$, $Nl\alpha 8$ and $Nl\beta 1$ are co-assembled into another receptor, which constitutes the higher affinity binding site. Imidacloprid resistance was found not only related to insect nAChRs, but also influenced by insect nAChRs accessory protein, such as lynx proteins in *N. lugens*, the insect nAChRs modulators. Most achievements mentioned here were newly reported, and are important to understand the resistance mechanisms to neonicotinoid insecticides and the pharmacological properties of insect nAChRs.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971917); 新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-06-0494)

作者简介: 刘泽文, 男, 1977 年 10 月生, 安徽望江人, 博士, 教授, 主要从事害虫抗药性分子机理和昆虫神经生物学研究, E-mail: jemunson@njau.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: jemunson@njau.edu.cn

收稿日期 Received: 2010-03-30; 接受日期 Accepted: 2010-06-20

Key words: *Nilaparvata lugens*; nicotinic acetylcholine receptor; subunit composition; neonicotinoids; insecticide resistance

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål (brown planthopper, BPH) 是最重要的水稻害虫之一, 20 世纪 70 年代后大发生频次增加, 在亚洲许多国家和地区的水稻产区均有发生。长期以来, 褐飞虱的防治主要以化学防治为主, 20 世纪 40 ~ 50 年代大量使用有机氯类杀虫剂防治褐飞虱; 20 世纪 60 年代后被有机磷类和氨基甲酸酯类杀虫剂所取代; 20 世纪 80 年代以来, 昆虫生长调节剂扑虱灵和新型高效杀虫剂吡虫啉先后被开发应用, 由于其卓越的防效, 近年来已上升为防治褐飞虱的主要农药品种。2005 年由于褐飞虱对吡虫啉抗性水平的上升, 氟虫腈开始用于褐飞虱的防治; 而从 2009 年氟虫腈被禁用后, 吡蚜酮又成为当家品种。从近 30 年褐飞虱的化学防治来看, 都存在一个问题, 即单一杀虫剂品种长时间单独使用, 给褐飞虱造成很大的杀虫剂抗性选择压力, 致使亚洲不少国家和地区褐飞虱对常用杀虫剂产生了不同程度的抗药性。基于国内外近年来在褐飞虱抗药性和靶标毒理学方面的研究进展迅速, 本文就褐飞虱对新烟碱类杀虫剂吡虫啉抗性机理和靶标分子毒理学方面的研究进行了概括性的介绍。

1 昆虫烟碱型乙酰胆碱受体

在脊椎动物和无脊椎动物中, 烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs)都是十分重要的神经递质受体。nAChRs 是一种五亚基跨膜复合体, 功能单位是由 5 个亚基组成的五聚体结构, 包含了生理反应的所有结构要素: 激动剂/竞争性拮抗剂结合位点, 离子通道以及对它们进行快速调节的偶联机制(Arias, 1997; Corringer *et al.*, 2000)。昆虫 nAChRs 是几类杀虫剂的作用靶标, 尤其是新烟碱类杀虫剂, 近年来得到广泛而深入的研究(Matsuda *et al.*, 2001)。

通过对冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、意大利蜜蜂 *Apis mellifera*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 基因组序列分析, 鉴定了大量的 nAChRs 亚基, 并对部分亚基进行了分子生物学验证, 为昆虫 nAChRs 研究提供了丰富材料; 同时, 在桃蚜 *Myzus persicae*、褐飞虱 *N. lugens*、飞蝗 *Locusta migratoria*、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 等重要农业害虫中, 通过生物化学和分子

生物学的方法, 获得了大量的 nAChRs 亚基材料, 这些材料为昆虫 nAChRs 研究提供了坚实的基础(Jones *et al.*, 2007)。利用异源表达系统, 比如果蝇 S2 细胞系统、蛙卵细胞系统, 对昆虫 nAChRs 亚基功能进行了广泛研究(Tomizawa *et al.*, 2005)。但是, 在昆虫 nAChRs 亚基功能研究中, 始终有两个问题没有解决: (1) 昆虫神经系统中 nAChR 的亚基组成, 即 nAChRs 五聚体功能单位到底是由哪些亚基构成的? 对昆虫 nAChRs 亚基进行各种组合尝试都没能表达出受体功能, 即使将来自于同一种昆虫的所有亚基共同表达仍然不成功, 由于昆虫 nAChRs α 亚基与哺乳动物 β 亚基共表达表现出正常的受体功能, 所以一般认为问题可能出现在昆虫的非 α 亚基上(Millar, 2003)。(2) 同型五聚体。在几种昆虫中均发现了与哺乳动物同型五聚体亚基相类似的亚基, 如冈比亚按蚊的 $\alpha 6 \sim \alpha 9$ 、意大利蜜蜂的 $\alpha 6 \sim \alpha 9$ 、黑腹果蝇 $\alpha 6 \sim \alpha 7$ 及 $\alpha 9$ 、烟芽夜蛾的 $\alpha 7$ 亚基等, 但是这些亚基单独表达并不能表现出如脊椎动物同型五聚体亚基类似的受体功能(Sattelle *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2005, 2006)。

2 作用于 nAChR 的杀虫剂及抗药性

目前开发利用的杀虫剂大多作用于昆虫的神经系统, 如离子通道、神经递质受体、神经系统中起重要作用的酶类等, 而作用于昆虫 nAChRs 的神经毒剂更是近年来研制开发的重点(Casida and Quistad, 1998; Tomizawa and Casida, 2001)。作用于昆虫 nAChRs 的杀虫剂基本上可以分成 4 类: 生物碱类(包括烟碱)、新烟碱类、沙蚕毒素类和多杀菌素类。

以烟碱为代表的植物生物碱类, 是最先发现的作用于昆虫 nAChRs 的化合物, 除了烟碱外, 还包括毒藜碱、野靛碱、山梗菜碱、筒箭毒碱、甲基牛扁碱、二氢- β -刺桐啉碱等。由于这些生物碱类杀虫效果低、对非靶标生物毒性高等缺点, 虽然发现较早, 在害虫防治上一直没有进行深入研究和开发利用, 仅烟碱作为熏蒸剂有一定的应用(Copping and Menn, 2000)。

新烟碱类是研究最深入、开发利用最成功的作用于昆虫 nAChRs 的杀虫剂, 从 20 世纪 90 年代初第一个新烟碱类杀虫剂吡虫啉开发成功后, 目前已

经有 7 个品种 [吡虫啉 (imidacloprid)、噻虫啉 (thiacloprid)、烯啶虫脒 (nitenpyram)、啉虫脒 (acetamiprid)、噻虫嗪 (thiamethoxam)、噻虫胺 (clothianidin)、呋虫胺 (dinotefuran)] 问世, 这类杀虫剂因选择性好、高效低毒、内吸性强等特点, 在农业害虫和卫生害虫防治上都得到广泛应用 (Tomizawa and Casida, 2005)。根据 7 种新烟碱类杀虫剂的结构特点, 将其分成 3 类: 氯吡啶类 (acetamiprid, imidacloprid, nitenpyram, thiacloprid)、氯噻唑类 (clothianidin, thiamethoxam) 和四氢呋喃类 (dinotefuran) (Liu *et al.*, 2006)。新烟碱类杀虫剂的高选择性来自于杀虫剂带负电荷的硝基或者氰基与昆虫 nAChR 中配基结合部位带正电荷的氨基酸残基 (如赖氨酸、精氨酸或组氨酸) 的互作 (Tomizawa *et al.*, 2003)。虽然从第一个新烟碱类杀虫剂吡虫啉开始大量使用至今已有 19 年历史, 但是除褐飞虱 *N. lugens*、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 和烟粉虱 *Bemisia tabaci* 抗性近年来发展迅速外, 多数靶标害虫对该类杀虫剂抗性的发展都很缓慢。目前, 褐飞虱已经表现出对吡虫啉高抗水平, 而抗吡虫啉的马铃薯甲虫和烟粉虱发生地域也日趋广泛 (Nauen and Denholm, 2005; Mota-Sanchez *et al.*, 2006)。通过吡虫啉室内连续筛选, 在银叶粉虱 *Bemisia argentifolii*、褐飞虱 *N. lugens*、烟粉虱 *B. tabaci* 等害虫中获得了高抗品系, 为害虫抗吡虫啉机理研究提供了宝贵材料 (Prabhaker *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2003; Rauch and Nauen, 2003; Liu and Han, 2006)。

沙蚕毒素是从异足索蚕 *Lumbriconereis heteropoda* (俗称沙蚕) 中分离的一种化合物, 具有杀虫活性 (Lee *et al.*, 2003), 根据沙蚕毒素的化学结构, 合成了几个沙蚕毒素类杀虫剂品种, 如杀螟丹、杀虫磺、杀虫单、杀虫双、杀虫环等。与烟碱和新烟碱类不同, 沙蚕毒素虽然也作用于昆虫的 nAChRs, 但却并不是 nAChRs 的激动型配基, 而是 nAChRs 的非竞争性拮抗剂, 通过阻断离子通道达到抑制昆虫神经兴奋的作用机理 (Lee *et al.*, 2003)。

多杀菌素类是从刺糖多胞菌 *Saccharopolyspora spinosa* (俗称多杀菌) 分离的 10 种大环内酯类化合物 (分别命名为多杀菌素 A ~ J) 的总称, 作为杀虫剂开发的 Spinosad 实际上是多杀菌素 A 和 D 的混合物 (Thompson *et al.*, 2000)。多杀菌素类可以延长昆虫神经系统的过度兴奋, 对棉花夜蛾类害虫和苜蓿蓟马 *Frankliniella occidentalis* 等具有良好的效

果。研究发现, 多杀菌素作用靶标并不专一, 可能同时作用于昆虫 nAChRs 和 γ 氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 受体 (Watson, 2001; Salgado and Saar, 2004)。虽然多杀菌素类与烟碱、新烟碱类同样作用于昆虫 nAChRs, 但是它们作用的 nAChRs 亚基却不相同, 多杀菌素类作用于黑腹果蝇 *D. melanogaster* nAChRs 的 $\alpha 6$ 亚基 (Orr *et al.*, 2006), 但新烟碱类却不与黑腹果蝇 $\alpha 6$ 亚基结合 (Lansdell and Millar, 2004)。部分害虫已经对多杀菌素产生了极高水平抗性, 包括小菜蛾 *Plutella xylostella* (10 000 倍)、烟芽夜蛾 *H. virescens* (1 000 倍) 等 (Wyss *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2006)。在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和苜蓿蓟马 *F. occidentalis* 等重要靶标害虫中, 对多杀菌素类的抗药性在逐年增加 (Gunning, 2002; Loughner *et al.*, 2005)。

3 褐飞虱对吡虫啉抗药性机理

通过室内连续 37 代的筛选, 南京农业大学韩召军、刘泽文课题组获得了第一个高抗吡虫啉的褐飞虱品系, 抗性倍数达到 250 倍。增效试验和生化分析表明, 细胞色素 P450 单加氧酶活力的变化是害虫对吡虫啉抗性发展的重要生化机理 (Liu *et al.*, 2003; Nauen and Denholm, 2005), 但是关于哪个家族和哪个 P450 单加氧酶在褐飞虱对吡虫啉抗性中起主要作用还有待鉴定。

虽然很多害虫的 nAChR 亚基被成功鉴定或克隆, 并且在高抗新烟碱类杀虫剂的品系中寻找抗性相关的变异, 但仅在筛选的褐飞虱高抗品系中首次发现并证实了抗性相关突变, 该突变发生在褐飞虱 nAChR N1 α 1 和 N1 α 3 亚基的 B 环上, 导致 151 位的酪氨酸替换成丝氨酸。对抗性和敏感品系内源 nAChRs 与吡虫啉结合特性研究发现, 抗性品系褐飞虱与吡虫啉的结合量只有敏感品系结合量的 2% (Liu *et al.*, 2005)。果蝇 S2 细胞异源表达显示, 该突变对吡虫啉与褐飞虱 $\alpha 1$ 亚基的结合具有十分显著的影响, 该突变不仅造成了靶标与吡虫啉结合量的差异, 同时也显著降低了吡虫啉与靶标的亲和力, 从而导致抗药性的产生 (Liu *et al.*, 2005)。通过蛙卵表达系统分析, 发现该突变对内源神经递质乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 与昆虫神经受体 nAChRs 的结合没有显著影响, 但对包括吡虫啉在内的 7 个新烟碱类杀虫剂的 nAChRs 靶标结合影响显著, 从而证实该突变还与褐飞虱对其他 6 个新烟

碱类杀虫剂的交互抗性密切相关(Liu *et al.*, 2006)。

4 褐飞虱烟碱型乙酰胆碱受体的亚基组成

由于 Y151S 在褐飞虱的两个亚基(Nl α 1 和 Nl α 3)上的首次发现,因此南京农业大学昆虫神经毒理学实验室以这两个亚基为中心,对褐飞虱 nAChRs 的亚基组成进行了深入研究。

通过体外表达系统表达和内源 nAChRs 的免疫共沉淀技术,已经证实果蝇和桃蚜 nAChRs 的 α 1 和 α 3 共聚于同一个受体中(Huang *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2000)。对褐飞虱的 Nl α 1 和 Nl α 2 进行体外表达,发现这两个 α 亚基与哺乳动物的 β 2 亚基共聚,组成一个三亚基五聚体受体(Nl α 1/Nl α 2/r β 2)(Liu *et al.*, 2009b)。对褐飞虱内源 nAChRs 进行免疫共沉淀分析,证实了这两个亚基在褐飞虱神经系统中确实共聚于一个五聚体中(Li *et al.*, 2010)。

由于 Nl α 3 亚基独立表达或者与哺乳动物 r β 2 共表达都不成功,这促使研究者寻找与 Nl α 3 亚基共表达的褐飞虱其他亚基。褐飞虱 nAChRs 亚基不同组合表达发现, Nl α 3 亚基可以与 Nl α 8 亚基共表达,与哺乳动物 r β 2 在体外重组成另外一个三亚基五聚体(Nl α 3/Nl α 8/r β 2),这在昆虫 nAChRs 亚基组成中为首次发现(Zhang *et al.*, 2009)。

随后,研究者以这两个三亚基五聚体为基础,对 Nl α 1 和 Nl α 3 中发现的 Y151S 突变功能影响进行了分析。Nl α 3/Nl α 8/r β 2 对吡虫啉的敏感性($EC_{50} = 3.2 \pm 0.5 \mu\text{mol/L}$)比 Nl α 1/Nl α 2/r β 2($EC_{50} = 350.4 \pm 16.8 \mu\text{mol/L}$)高出 109 倍。与敏感受体(Nl α 1/Nl α 2/r β 2)相比, Nl α 1^{Y151S}突变只造成受体 Nl α 1^{Y151S}/Nl α 2/r β 2($EC_{50} = 624 \pm 24 \mu\text{mol/L}$)对吡虫啉敏感性下降 1.8 倍。而与敏感受体(Nl α 3/Nl α 8/r β 2)相比, Nl α 3^{Y151S}突变造成受体 Nl α 3^{Y151S}/Nl α 8/r β 2($EC_{50} = 29.5 \pm 3.9 \mu\text{mol/L}$)对吡虫啉敏感性下降 9.2 倍。结合两个受体敏感性差异,说明 Nl α 3^{Y151S}突变在吡虫啉靶标不敏感性中的作用更重要(Liu *et al.*, 2009b; Zhang *et al.*, 2009)。因此,在褐飞虱对吡虫啉靶标抗性监测检测中,需要对 Nl α 1 和 Nl α 3 上的 Y151S 同时进行,尤其是 Nl α 3 上的 Y151S 突变,这是前期褐飞虱抗药性分子检测中的不足之处之一。

5 褐飞虱中吡虫啉结合位点的受体组成

与其他半翅目头喙亚目(叶蝉)和胸喙亚目(蚜虫)一样(Lind *et al.*, 1998; Tomizawa *et al.*, 2005),褐飞虱神经系统中也存在两个吡虫啉结合位点(Liu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010)。新烟碱类杀虫剂同时作用于这两个结合位点,是保证该类杀虫剂高毒力特性的特点之一(Xu *et al.*, 2010)。为了了解褐飞虱神经系统中吡虫啉两个结合位点的组成,在前期体外亚基组成分析的基础上,对褐飞虱内源 nAChRs 与吡虫啉结合进行了深入研究。

应用免疫共沉淀技术研究发现褐飞虱 Nl α 1, Nl α 2 和 Nl β 1 3 个亚基在同一个内源受体中,构成内源受体 Nl α 1/Nl α 2/Nl β 1;而 Nl α 3, Nl α 8 和 Nl β 1 在另外一个内源受体中,构成内源受体 Nl α 3/Nl α 8/Nl β 1,同一个受体中的亚基具有直接的蛋白互作关系(Li *et al.*, 2010)。利用不同亚基的特异抗体对褐飞虱头部膜蛋白中的亚基进行逐个免疫消除,发现 Nl α 1/Nl α 2/Nl β 1 构成吡虫啉低亲和力位点($K_d = 1.5 \pm 0.2 \text{ nmol/L}$),而 Nl α 3/Nl α 8/Nl β 1 构成吡虫啉高亲和力位点($K_d = 3.5 \pm 0.6 \text{ pmol/L}$)。这一结果与体外重组受体 Nl α 1/Nl α 2/r β 2 和 Nl α 3/Nl α 8/r β 2 的研究结果一致,由此也进一步说明 Nl α 3^{Y151S}突变在吡虫啉靶标不敏感性中的作用更重要(Liu *et al.*, 2009b; Zhang *et al.*, 2009)。

6 褐飞虱烟碱型乙酰胆碱受体的附属蛋白及与抗药性的关系

试图外源组建昆虫功能性 nAChRs(所有亚基均来源于昆虫)的研究一直是国际研究热点,但近 20 年来一直没有突破。虽然很多昆虫 nAChRs 所有亚基都鉴定出来了(通过基因组测序),但即使将这些亚基一起表达都没能组建功能受体,启发研究者们认为昆虫 nAChRs 组成有其特殊性,昆虫神经系统中存在与 nAChRs 互作的小分子附属蛋白,这些蛋白在昆虫 nAChRs 亚基组成中起到协助作用,甚至是决定性的作用。Lansdell 等(2008)从果蝇中鉴定的第一个昆虫 nAChRs 伴侣蛋白 Dm-Ric-3, Choo 等(2008)从萤火虫 *Pyrocoelia rufa* 中鉴定了第一个昆虫 nAChRs 调控蛋白 Pr-lynx1,这些蛋白质在昆虫 nAChRs 的蛋白功能、复杂结构组成、蛋白折叠与成熟等方面起到十分重要的作用。

通过褐飞虱 EST 文库筛选 (Noda *et al.*, 2008)、免疫沉淀和体外验证等技术, 从褐飞虱神经系统中鉴定了两种调控蛋白, 与调控蛋白 Pr-lynx1 一样, 这两个调控蛋白同属于 Ly-6/neurotoxin 家族, 分别命名为 Nl-lynx1 和 Nl-lynx2, 这两个调控蛋白都可以提高昆虫 α 亚基与哺乳动物 β 亚基复合受体的表达水平, 而且在不同的亚基组成受体间存在显著差异 (Liu *et al.*, 2009a)。同时发现, 这两个调控蛋白都与 Y151S 突变的功能有关, 影响褐飞虱对吡虫啉的抗性水平, 预示着这类蛋白质同样可以成为杀虫剂的攻击靶标, 也意味着昆虫 nAChRs 的附属蛋白同样可以作为杀虫剂开发的靶标蛋白。

7 小结与展望

虽然 nAChRs 是昆虫中枢神经系统中最主要的神经递质受体, 但是关于昆虫 nAChRs 的研究远远滞后于哺乳动物, 除了被受重视程度差异外, 昆虫 nAChRs 复杂性导致的研究难度也是一个重要的原因。研究者们在进行昆虫 nAChRs 方面的工作时, 都希望借鉴哺乳动物 nAChRs 的研究成果和经验, 比如外源表达功能验证、亚基组成测定等, 最终这些尝试都以失败而告终。但是这些失败并不是没有价值的, 它告诉我们昆虫 nAChRs 的研究必需了解其复杂性, 并针对性地展开研究。关于褐飞虱 nAChRs 毒理学方面的研究近几年进展较快, 主要就是吸收了前人研究成功的经验和失败的教训, 遵循昆虫 nAChRs 本身的特点, 从外源杂合受体表达和内源免疫共沉淀研究等不同方面, 在褐飞虱 nAChRs 亚基组成、抗药性相关突变、吡虫啉结合位点亚基组成等方面取得了较好的研究成果。

但是, 目前取得的研究成果还不完善, 比如褐飞虱神经系统中 nAChRs 种类不清楚、不同杀虫剂对应的 nAChRs 不清楚、与昆虫 nAChRs 互作的附属蛋白种类和数量不清楚, 这些问题集中到一点, 就是如何在外源表达系统中重组昆虫 nAChRs。目前关于昆虫 nAChRs 附属蛋白的研究都停留在单个蛋白的发现、功能验证与结构分析上, 属于个体研究水平, 而且鉴定出来的蛋白并没有解决昆虫 nAChRs 体外重组上的瓶颈问题, 即体外构建功能性昆虫 nAChRs。未来这方面的研究将结合昆虫基因组学技术、蛋白质组学技术、同位素标记与染色技术等, 对昆虫 nAChRs 及互作蛋白进行规模性功能与结构鉴定, 获取与受体互作的所有小分子附属蛋白, 将附属蛋白对亚基聚合的重要性进行分类,

构建体外昆虫 nAChRs 功能复合体 (受体 + 附属蛋白)。构建的昆虫 nAChRs 功能复合体可以用于蛋白质互作研究、受体与化合物互作机理研究、靶标杀虫剂的功能基团鉴定与结构优化、新杀虫剂的分子设计和选择性杀虫剂的结构改造。

参考文献 (References)

- Arias HR, 1997. Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Res. Rev.*, 25: 133 – 191.
- Casida JE, Quistad GB, 1998. Golden age of insecticide research: Past, present and future. *Ann. Rev. Entomol.*, 43: 1 – 16.
- Choo YM, Lee BH, Lee KS, Kim BY, Li J, Kim JG, Lee JH, Sohn HD, Nah SY, Jin BR, 2008. *Pr-lynx1*, a modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the insect. *Mol. Cell. Neurosci.*, 38: 224 – 235.
- Copping LG, Menn JJ, 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Manag. Sci.*, 56: 651 – 676.
- Corringer PJ, Le-Novere N, Changeux J P, 2000. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 40: 431 – 458.
- Gunning R, 2002. Heliothis insecticides resistance continues to climb. *Aust. Cottongrower*, 23: 71 – 73.
- Huang Y, Williamson MS, Devonshire AL, Windass JD, Lansdell SJ, Millar NS, 2000. Cloning, heterologous expression and co-assembly of Mp β 1, a nicotinic acetylcholine receptor subunit from the aphid *Myzus persicae*. *Neurosci. Lett.*, 284: 116 – 120.
- Jones AK, Brown LA, Sattelle DB, 2007. Insect nicotinic acetylcholine receptor gene families: from genetic model organism to vector, pest and beneficial species. *Invert. Neurosci.*, 7: 67 – 73.
- Jones AK, Grauso M, Sattelle DB, 2005. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genomics*, 85: 176 – 187.
- Jones AK, Raymond-Delpech V, Thany SH, Gauthier M, Sattelle DB, 2006. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Res.*, 16: 1422 – 1430.
- Lansdell SJ, Collins T, Yabe A, Gee VJ, Gibb AJ, Millar NS, 2008. Host-cell specific effects of the nicotinic acetylcholine receptor chaperone RIC-3 revealed by a comparison of human and *Drosophila* RIC-3 homologues. *J. Neurochem.*, 105: 1573 – 1581.
- Lansdell SJ, Millar NS, 2004. Molecular characterization of D α 6 and D α 7 nicotinic acetylcholine receptor subunits from *Drosophila*: Formation of a high-affinity α -bungarotoxin binding site revealed by expression of subunit chimeras. *J. Neurochem.*, 90: 479 – 489.
- Lee SJ, Tomizawa M, Casida JE, 2003. Nereistoxin and cartap neurotoxicity attributable to direct block of the insect nicotinic receptor/channel. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 2646 – 2652.
- Li J, Shao Y, Ding ZP, Bao HB, Liu ZW, Han ZJ, Millar NS, 2010. Native subunit composition of two insect nicotinic receptor subtypes with differing affinities for the insecticide imidacloprid. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40: 17 – 22.
- Lind RL, Clough MS, Reynolds SE, Earley FGP, 1998. [3 H] Imidacloprid labels high- and low-affinity nicotinic acetylcholine

- receptor-like binding sites in the Aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 62: 3–14.
- Liu ZW, Cao GC, Li J, Bao HB, Zhang YX, 2009a. Identification of two *Lynx* proteins in *Nilaparvata lugens* and the modulation on insect nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.*, 110: 1707–1714.
- Liu ZW, Han ZJ, 2006. Fitness costs of laboratory-selected imidacloprid resistance in brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. *Pest Manag. Sci.*, 62: 279–282.
- Liu ZW, Han ZJ, Wang YC, Zhang LC, Zhang HW, Liu CJ, 2003. Selection for imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*: Cross-resistance patterns and possible mechanisms. *Pest Manag. Sci.*, 59: 770–775.
- Liu ZW, Han ZJ, Zhang YX, Song F, Yao XM, Liu SH, Gu JH, Millar NS, 2009b. Heteromeric co-assembly of two insect nicotinic acetylcholine receptor α subunits: Influence on sensitivity to neonicotinoid insecticides. *J. Neurochem.*, 108: 498–506.
- Liu ZW, Williamson MS, Lansdell SJ, Denholm I, Han ZJ, Millar NS, 2005. A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *PNAS*, 102: 8420–8425.
- Liu ZW, Williamson MS, Lansdell SJ, Han ZJ, Denholm I, Millar NS, 2006. A nicotinic acetylcholine receptor mutation (Y151S) causes reduced agonist potency to a range of neonicotinoid insecticides. *J. Neurochem.*, 99: 1273–1281.
- Loughner RL, Warnock DF, Cloyd RA, 2005. Resistance of greenhouse, laboratory, and native populations of western flower thrips to spinosad. *HortScience*, 40: 146–149.
- Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB, 2001. Neonicotinoids: Insecticides acting on insect nicotinic receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 22: 573–580.
- Millar NS, 2003. Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Soc. Trans.*, 31: 869–874.
- Mota-Sanchez D, Hollingworth RM, Grafius EJ, Moyer DD, 2006. Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Manag. Sci.*, 62: 30–37.
- Nauen R, Denholm I, 2005. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: Current status and future prospects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 58: 200–215.
- Noda H, Kawai S, Koizumi Y, Matsui K, Zhang Q, Furukawa S, Shimomura M, Mita K, 2008. Annotated ESTs from various tissues of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*: a genomic resource for studying agricultural pests. *BMC Genomics*, 9: 117. doi: 10.1186/1471-2164-9-117.
- Orr N, Hasler J, Watson G, Mitchell J, Gustafson G, Gifford J, Geng C, Chouinard S, Cook K, 2006. Spinosad: from nature to green chemistry to novel mode of action. In: 11th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry Abstracts, Kobe, Japan. 27.
- Prabhaker N, Toscano NC, Castle SJ, Henneberry TJ, 1997. Selection for imidacloprid resistance in silverleaf whiteflies from the Imperial Valley and development of a hydroponic bioassay for resistance monitoring. *Pestic. Sci.*, 51: 419–428.
- Rauch N, Nauen R, 2003. Identification of biochemical markers linked to neonicotinoid cross-resistance in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 54: 165–176.
- Salgado VL, Saar R, 2004. Desensitizing and non-desensitizing subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. *J. Insect Physiol.*, 50: 867–879.
- Sattelle DB, Jones AK, Sattelle BM, Matsuda K, Reenan R, Biggin PC, 2005. Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. *Bioessays*, 27: 366–376.
- Schulz R, Bertrand S, Chamaon K, Smalla KH, Gundelfinger ED, Bertrand D, 2000. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors from *Drosophila*: Two different types of α subunits coassemble within the same receptor complex. *J. Neurochem.*, 74: 2537–2546.
- Thompson GD, Dutton R, Sparks TC, 2000. Spinosad – a case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Manag. Sci.*, 56: 696–702.
- Tomizawa M, Casida JE, 2001. Structure and diversity of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Pest Manag. Sci.*, 57: 914–922.
- Tomizawa M, Casida JE, 2005. Neonicotinoid insecticide toxicity: Mechanisms of selective action. *Ann. Rev. Entomol.*, 45: 247–268.
- Tomizawa M, Millar NS, Casida JE, 2005. Pharmacological profiles of recombinant and native insect nicotinic acetylcholine receptors. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35: 1347–1355.
- Tomizawa M, Zhang N, Durkin KA, Olmstead MM, Casida JE, 2003. The neonicotinoid electronegative pharmacophore plays the crucial role in the high affinity and selectivity for the *Drosophila* nicotinic receptor: an anomaly for the nicotinoid cation- π interaction model. *Biochem.*, 42: 7819–7827.
- Watson GB, 2001. Actions of insecticidal spinosyns on γ -aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 71: 20–28.
- Wyss CF, Young HP, Shukla J, Roe RM, 2003. Biology and genetics of a laboratory strain of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), highly resistant to spinosad. *Crop Prot.*, 22: 307–314.
- Xu XY, Bao HB, Shao XS, Zhang YX, Yao XM, Liu ZW, Li Z, 2010. Pharmacological characterization of *cis*-nitromethylene neonicotinoids in relation to imidacloprid binding sites in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Mol. Biol.*, 19: 1–8.
- Zhang YX, Liu ZW, Han ZJ, Song F, Yao XM, Shao Y, Li J, Millar NS, 2009. Functional co-expression of two insect nicotinic receptor subunits (Nl α 3 and Nl α 8) reveals the effects of a resistance-associated mutation (Nl α 3^{Y151S}) on neonicotinoid insecticides. *J. Neurochem.*, 110: 1855–1862.
- Zhao JZ, Collins HL, Li YX, Mau RF, Thompson GD, Hertlein M, Andalaro JT, Boykin R, Shelton AM, 2006. Monitoring of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad, indoxacarb, and emamectin benzoate. *J. Econ. Entomol.*, 99: 176–181.

(责任编辑: 赵利辉)